

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭63-109781

⑬ Int.Cl.*

C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68
// G 01 N 33/53
33/577

識別記号

府内整理番号

8412-4B
8412-4B
D-7906-2G
7906-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月14日

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 rec A蛋白様蛋白と抗rec A蛋白様蛋白单クローン抗体と併用した簡便なDループ生成法

⑯ 特願 昭61-254993

⑰ 出願 昭61(1986)10月27日

⑱ 発明者 牧野修 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

⑲ 発明者 柴田武彦 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

⑳ 出願人 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号

㉑ 代理人 弁理士 中村稔 外4名

明細書

1. 発明の名称 rec A蛋白様蛋白と抗rec A蛋白様蛋白单クローン抗体と併用した簡便なDループ生成法

2. 特許請求の範囲

- (1) 閉環状二重鎖DNAと該二重鎖DNAと共に塩基配列を有する単鎖DNA断片とをrec A蛋白様蛋白と抗rec A蛋白様蛋白单クローン抗体で処理することからなる閉環状二重鎖DNAにDループ構造を形成する方法。
- (2) rec A蛋白様蛋白が大腸菌rec A蛋白である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。
- (3) rec A蛋白様蛋白がT4ファージ由来のuvsX蛋白、枯草菌由来のrec蛋白又は黒麹菌(Ustilago)由来のrec 1蛋白である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。
- (4) 抗rec A蛋白様蛋白单クローン抗体がARM 193である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、閉環状二重鎖DNAにDループ構造を形成する方法に関する。更に詳しくはrec A蛋白様蛋白と抗rec A蛋白様蛋白单クローン抗体と併用するDループの形成方法に関する。

〔従来の技術〕

Dループは、第1図に示すように、互いに共通の塩基配列をもつ二重鎖DNAと単鎖DNAとから形成される複合体である。二重鎖DNAの一方の鎖と単鎖DNAとの間で塩基対を作りヘテロ二重鎖と呼ばれる二重鎖構造を作り、一方相手を失った二重鎖DNAの他方の鎖がループ状になっている。このDループは、クローニングした遺伝子の任意の部分に突然変異を導入する技術に用いられている(Shortle et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5375, Green and Tibbets (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2455)。また、この構造を高い頻度で作ることができれば、遺伝子の構造研究、遺伝子診断などに役立つ特別

な塩基配列をもつDNAを拾い出す技術などが実現できる。端の全く無い、いわゆる閉環状二重鎖DNAで天然に存在する型のものは右巻きの（負の）超ラセンを持っている。この負の超ラセンを持つ閉環状二重鎖DNAの上のDループは、通常の二重ラセンと同じ程度の高度の安定性を持つ。遺伝子のクローニングの多くに用いられるプラスミドもその殆どが負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNAであり、Dループ形成を利用した技術を考える時、その対象となるDNAは殆どの場合、負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNAである。一方、端を持つ二重鎖DNAの上のDループは非常に不安定である。

〔発明が解決しようとする問題点〕

大腸菌のrecA蛋白や他生物のrecA蛋白類似蛋白は、Dループ生成の反応を、ATPの助けによって10万～100万倍も加速する。即ち、これらの蛋白を利用すると、ごく微量のDNAを用いて、短時間で高い収率でDループを作らせる事ができる。（柴田武彦（1986）。recA蛋白

によるDNA組換え反応、臨連協会誌81：86）ところが、単鎖状態では非常に安定な閉環状二重鎖DNA上のDループは、反応液の中では、Dループ形成を行うrecA蛋白そのものの働きによって、形成の後、二重鎖DNAと単鎖DNAとに解離されてしまう。そこで、高い収率で閉環状二重鎖DNAの上にDループを得るには、recA蛋白の量または、反応の時間を、用いる2種類のDNAの量に応じて厳密に調節しなければならない。この特性は、recA蛋白によるDループ形成を技術として利用する場合、非常に不利である。

そこで本発明はこのようなrecA蛋白様蛋白の持つ特性を改良し、容易にDループを形成する方法を提供することを目的とする。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、閉環状二重鎖DNAと該二重鎖DNAと共通の塩基配列を有する単鎖DNA断片とをrecA蛋白様蛋白と抗recA蛋白様蛋白单クローン抗体とで処理することからなる閉環状二重鎖DNAにDループ構造を形成する方法に関する。

以下本発明について説明する。

本発明において用いる閉環状二重鎖DNAとしては、既知、未知を問わざいかなる閉環状二重鎖DNAであってもよい。また、単鎖DNA断片は、該二重鎖DNAと共通の塩基配列を有するものであれば、DNAの大きさ等に特に制限はない。

本発明に用いるrecA蛋白様蛋白としては、例えば大腸菌recA蛋白並びに類似蛋白であるT4ファージ由来のuvsX蛋白、枯草菌由来のrec蛋白及び黒麹菌(Ustilago)由来のrecI蛋白等を挙げることができる。これらの蛋白は例えば[recA; Shibata et al. (1983) Methods in Enzymology 100:197, uvsX; Yonesaki et al. (1985) Eur. J. Biochem. 148:127, rec蛋白; Lovett and Roberts (1985) J. Biol. Chem. 260:3305, recI; Kmieć and Hollman (1982) Cell 29:3677]の記載に基いて単離することができる。

また抗recA蛋白様蛋白单クローン抗体の代表例としては、ARM193が挙げられ、例えば牧野らの方法(Makinoら(1985)J.Biol.Chem. 260:

15402)によって入手することができる。

recA蛋白に対して作った单クローン抗体はそれぞれ、recA蛋白のもつ多種類の活性に対して様々な異なる挙動を示す(Makinoら(1985)J. Biol. Chem. 260:15402)。その中の一群の单クローン抗体(たとえばARM193)は、recA蛋白によるDループ形成の反応をあまり阻害しないが、recA蛋白による閉環状二重鎖DNA上のDループの解離反応を強く阻害する。そこで、recA蛋白による負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNAと単鎖DNAとを基質とするDループ形成反応の系に、この抗体(たとえばARM193)をrecA蛋白に対して十分量加えると、Dループの解離を抑え、高い収率でDループを得ることができるようになる。この場合、recA蛋白の量は単に単鎖DNAに対して十分量で有れば良く(予測されるDNA量に対し余分に加えるだけで良い)、また反応時間も30分もあれば十分であり、抗体を使わない時のようない蛋白量、時間の厳密な調節は不要となる。

以下本発明を実施例により説明する。

実施例

1. 材 料

- (1) rec A 蛋白、³Hで標識したファージfd複製中間体 (RF I) DNA (負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNA)、ファージfdのファージ粒子の単鎖DNAの断片；これらは柴田ら(1983)Methods in Enzymology, vol. 100, pp. 197の記述にしたがって調製した。
- (2) 抗 rec A 蛋白单クローニング抗体；ARM 193 をWakino et al. (1985) J. Biol. Chem. 260 :15402の記述にしたがってアフィニティーコロマトによって調製して用いた。

2. 反応液

3.1 mM Tris-HCl 2 缶衝液 (pH 7.5)、1.3 mM 塩化マグネシウム、1.8 mM ブチオスレイトール、8.8 μM 牛血清アルブミン、1.3 mM ATP、ATP再生系 (7.8 mM リン酸クレアチニン、リン酸クレアチニナーゼ)、3.7 μM (スクレオチド残基で) [³H] fd RF I DNA、

0.40 μM (スクレオチド残基で) fd 单鎖DNA断片、0.50 μM rec A蛋白、0.50 μM ARM 193。反応液の体積は2.1 μl～0.2 ml。

3. 反 応

ATP、塩化マグネシウム、单鎖DNA、二重鎖DNA、ATP再生系を除いた反応液の中で、rec A蛋白とARM 193とを37度で5分間保溫した。次に、塩化マグネシウム、2種類のDNA、ATP再生系 (ATPは無し) を加え、さらに2分間37度で保溫した。Dループ形成反応はATPを添加することによって開始した。第2図に示した時間、37度で保溫した後、2.0 μlずつサンプルとして採取した。採取したサンプルはEDTAとSarkosylとによって処理し、蛋白を除いた後、Dループアッセイ (柴田ら(1983)Methods in Enzymology, vol. 100, pp. 197) によって、できたDループの量を測定した。できたDループの量は、DループとなったRF I DNAの反応系に加えたRF I DNAに対する百分率で表した。第2図にお

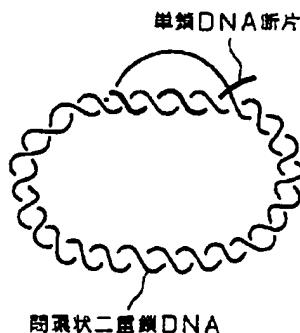
いて●は上記の反応によってできたDループの量を示す。○は抗体 (ARM 193) を加えなかった時のDループの量の時間変化を示す。■は上記の反応系のfdのファージ单鎖DNA断片をφX174のファージ单鎖DNA断片に置き換えた場合を示す。φX174とfdとは互いに相同な塩基配列は持たないので、Dループはできない。□はφX174の单鎖DNA断片を用い、更に、ARM 193を除いた場合を示す。

抗体が無い場合には一度できたDループが反応時間の経過と共に完全に解離されてしまうが、抗体ARM 193が有る場合には、10分で50%の閉環状二重鎖DNAがDループになり、1時間経過してもそのままの量を保っている。

4. 図面の簡単な説明

第1図はDループを形成している閉環状二重鎖DNAを示し、第2図は、実施例の結果であるDループ形成の経時変化を示す。

第1図



第2図

